

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> <b>C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 9/00, C07K 16/18, C12Q 1/68, G01N 33/68, C12N 15/11, A61K 31/70, 38/17</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/55316</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 21. September 2000 (21.09.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE00/00767 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 8. März 2000 (08.03.00)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 199 11 992.9 17. März 1999 (17.03.99) DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> GRUMMT, Ingrid [DE/DE]; Am Pferchelhang 39, D-69118 Heidelberg (DE). VIN- GRON, Martin [AT/DE]; Edingerstrasse 11, D-69123 Hei- delberg (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler, Trud- eringer Strasse 246, D-81825 München (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
<b>(54) Title:</b> RNA POLYMERASE I TRANSCRIPTION FACTOR TIF-IA <b>(54) Bezeichnung:</b> RNA POLYMERASE I TRANSKRIPTIONSFAKTOR TIF-IA <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to an RNA polymerase I transcription factor TIF-IA and related proteins the concentration and/or activity of which is correlated with the cell proliferation rate, and to DNA sequences encoding said proteins. The invention also relates to ligands and antagonists binding to RNA polymerase I transcription factor TIF-IA or related proteins, and to antisense RNAs or ribozymes directed against the expression of TIF-IA. The inventive compounds are useful in the prophylaxis or treatment of diseases that are related to an increased or a reduced cell proliferation.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft einen RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA und dazu verwandte Proteine, deren Konzentration und/oder Aktivität mit der Zellproliferationsrate korreliert sind, sowie diese Proteine codierende DNA-Sequenzen. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner an RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA bzw. dazu verwandte Proteine bindende Liganden, Antagonisten, sowie gegen die TIF-IA Expression gerichtete Antisense-RNAs bzw. Ribozyme. Diese Verbindungen sind zur Prävention oder Behandlung von Erkrankungen von Nutzen, die mit einer erhöhten oder verringerten Zellproliferation in Zusammenhang stehen.</p>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidsschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

### **RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA**

Die vorliegende Erfindung betrifft einen RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA und dazu verwandte Proteine, deren Konzentration und/oder Aktivität mit der Zellproliferationsrate korreliert sind, sowie diese Proteine codierende DNA-Sequenzen. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner an RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA bzw. dazu verwandte Proteine bindende Liganden, beispielsweise Antikörper, Antagonisten, sowie gegen die TIF-IA Expression gerichtete Antisense-RNAs bzw. Ribozyme. Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung Arzneimittel und Diagnoseverfahren, bei denen die vorstehenden Verbindungen zur Anwendung kommen.

Die Synthese ribosomaler RNAs (rRNAs) durch RNA Polymerase I (Pol I) wird in Abhängigkeit von externen Signalen, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Hormonen, Nährstoffen und Effektoren für Wachstum und Differenzierung äußerst effizient reguliert. Dementsprechend ist in Tumorzellen, die unkontrolliertes Zellwachstum aufweisen, die rRNA-Syntheserate drastisch erhöht (Grummt, I.: "Regulation of Mammalian Ribosomal Gene Transcription by RNA Polymerase I.", Progr. NAR & Mol. Biol. (1999) 62, 109-154). Die molekularen Mechanismen, die die Transkriptionsaktivität von Klasse I-Genen mit dem Zellwachstum verknüpfen, sind allerdings noch weitgehend unbekannt. Die Aufklärung der Prozesse, durch die extrazelluläre Signale in den Zellkern bzw. Nukleolus übertragen werden, um dort die Transkriptionsrate positiv oder negativ zu beeinflussen, erfordert daher die strukturelle und funktionelle Analyse der am Transkriptionsprozess beteiligten Proteinfaktoren, die Untersuchung deren Wechselwirkungen sowie die Identifizierung modifizierender Enzyme, beispielsweise Proteinkinasen und Proteinphosphatasen, die die Aktivität bestimmter Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit von der zellulären Proliferationsrate regulieren.

Ein Faktor, der für die wachstumsabhängige Regulation der rDNA-Transkription verantwortlich ist, ist TIF-IA, dessen Konzentration und/oder Aktivität in Abhängigkeit von der Proliferationsrate der Zellen fluktuiert. TIF-IA wurde bereits 1983 funktionell identifiziert (Buttgereit et al., Nucleic Acids Res. 13 (1985), 8165-8180) und in den folgenden Jahren biochemisch charakterisiert (Mahajan und Thompson, J.Biol.Chem. 265 (1990), 16225-16233; Schnapp et al., Mol.Cell.Biol. 13 (1993), 6723-6732). Diese Untersuchungen lieferten folgende wichtige Befunde: (1) TIF-IA ist ein essentieller Initiationsfaktor für Pol I, der dem bakteriellen  $\sigma$ -Faktor funktionell homolog zu sein scheint. Wie für den  $\sigma$ -Faktor gezeigt, ist auch TIF-IA mit der Initiationskompetenten Form der Pol I, dem Pol I "Holo-Enzym", assoziiert und wird nach der Initiationsreaktion von Pol I freigesetzt; (2) die Menge und/oder Aktivität von TIF-IA korreliert mit der Proliferationsrate der Zellen, d.h. Extrakte aus Wachstums-arretierten Zellen sind transkriptionell inaktiv, sie können jedoch durch Zusatz von partiell gereinigtem TIF-IA komplementiert werden; und (3) die biochemische Aufreinigung von TIF-IA ergab, daß weniger als tausend TIF-IA-Moleküle selbst in exponentiell wachsenden Zellen vorhanden sind.

Aufgrund der biologischen Eigenschaften von TIF-IA kann davon ausgegangen werden, daß dieser bei der Prävention und/oder Behandlung von Erkrankungen nützlich sein kann, bei der eine Stimulation der Zellproliferation durch eine Aktivierung der zellulären rRNA-Synthese therapeutisch sinnvoll ist, beispielsweise zur Unterstützung der Gewebsregeneration nach Verletzungen oder Strahlentherapie. Andererseits kann auch die Möglichkeit der Inaktivierung von TIF-IA zur Proliferationshemmung bzw. zur Prävention und/oder Behandlung von Erkrankungen verwendet werden, die mit einer erhöhten Zellproliferation einhergehen, beispielsweise Tumorerkrankungen. Eine solche Inaktivierung kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen, beispielsweise auf genetischer Ebene ("Knock out", Hemmung der Translation durch Antisense-RNAs oder Ribozyme) oder Protein-Ebene (TIF-IA hemmende

Liganen oder Antagonisten, Kinase/Phosphatase-Inhibitoren, Hemmung der der Bindung von TIF-IA an Pol I etc.). Voraussetzung für die vorstehend diskutierten therapeutischen Möglichkeiten ist allerdings, daß TIF-IA als Protein in ausreichenden Mengen und in möglichst reiner Form zur Verfügung steht bzw. das TIF-IA codierende Gen, was einerseits dessen rekombinante Herstellung ermöglicht, andererseits auch eine auf Gentherapie basierende Behandlung. Allerdings war bisher selbst die partielle Reinigung von TIF-IA äußerst schwierig, da, wie bereits ausgeführt, das Protein nur in sehr geringen Mengen in der Zelle vorhanden und vermutlich darüber hinaus sehr labil ist. Ausgehend von mehreren hundert Litern kultivierter Zellen konnte TIF-IA zwar über eine Kombination von neun chromatographischen Schritten gereinigt werden, wobei die TIF-IA-Aktivität mit einem 75 kDa Protein korreliert (Schnapp et al., supra), allerdings waren bisher weder die Reinheit noch die Menge an biochemisch gereinigtem TIF-IA ausreichend, um dieses therapeutisch einsetzen bzw. um partielle Aminosäuresequenzen bestimmen zu können, was die Entwicklung von Sonden für das TIF-IA codierende Gen erlauben würde.

Somit liegt der vorliegenden Erfindung das technische Problem zugrunde, (1) das TIF-IA-Protein in ausreichender Menge und reiner Form und (2) das TIF-IA codierende Gen bereitzustellen, was beispielsweise dessen rekombinante Herstellung gestattet.

Die Lösung dieses technischen Problems wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen erzielt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit eine DNA-Sequenz, die einen RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA mit der in Figur 2 gezeigten Aminosäuresequenz codiert, wobei in einer bevorzugten Ausführungsform die DNA-Sequenz die in Figur 2 gezeigte Nucleinsäuresequenz enthält.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Isolierung einer cDNA-Sequenz, die humanen TIF-IA codiert. Da es bisher nicht möglich war, TIF-IA in solchen Mengen und in solcher Reinheit bereitzustellen, daß - beispielsweise von einer partiellen Aminosäuresequenz ausgehend - Sonden für die erfolgreiche Clonierung des Gens entwickelt werden konnten, wurde in der vorliegenden Erfindung eine andere Strategie zur Bestimmung des TIF-IA codierenden Gens eingeschlagen. Dabei wurde in Genbanken nach DNA-Sequenzen gesucht, die Homologie zu Genen aufweisen, die für die Pol I Transkription in Hefe verantwortlich sind. Diese Vorgehensweise, die schließlich zur Isolierung eines TIF-IA codierenden Clons führte, wird in den nachstehenden Beispielen ausführlich beschrieben.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner eine DNA-Sequenz, die ein Protein mit den biologischen Eigenschaften eines RNA Polymerase I Transkriptionsfaktors TIF-IA codiert, die sich von der DNA-Sequenz von Figur 2 in der Codonsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes unterscheidet, die mit den vorstehenden DNA-Sequenzen hybridisiert oder die ein Fragment, eine allelische Variante oder eine andere Variante der vorstehenden DNA-Sequenzen ist.

Der in der vorliegenden Erfindung verwendete Begriff "hybridisieren" bezieht sich auf konventionelle Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise auf Hybridisierungsbedingungen, bei denen als Lösung 5xSSPE, 1% SDS, 1xDenhardts-Lösung verwendet wird und/oder die Hybridisierungstemperaturen zwischen 35°C und 70°C, vorzugsweise bei 65°C liegen. Nach der Hybridisierung wird vorzugsweise zuerst mit 2xSSC, 1% SDS und danach mit 0,2xSSC bei Temperaturen zwischen 35°C und 70°C, vorzugsweise bei 65°C gewaschen (zur Definition von SSPE, SSC und Denhardts-Lösung siehe Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989)). Besonders bevorzugt sind stringente Hybridisierungsbedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., supra, beschrieben sind.

Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Begriffe "Varianten" oder "Fragment" umfassen DNA-Sequenzen, die sich gegenüber den in Figur 2 angegebenen Sequenzen durch Deletion(en), Insertion(en), Austausch(e) und/oder andere im Stand der Technik bekannte Modifikationen unterscheiden bzw. ein Fragment des ursprünglichen Nucleinsäuremoleküls umfassen, wobei das durch diese DNA-Sequenzen codierte Protein noch die biologischen Eigenschaften von TIF-IA aufweist und in Säugern biologisch aktiv ist. Dazu zählen auch Allelvarianten. Verfahren zur Erzeugung der vorstehenden Änderungen in der Nucleinsäuresequenz sind dem Fachmann bekannt und in Standardwerken der Molekularbiologie beschrieben, beispielsweise in Sambrook et al., supra. Der Fachmann ist auch in der Lage, zu bestimmen, ob ein von einer so veränderten Nucleinsäuresequenz codiertes Protein noch über die biologischen Eigenschaften von TIF-IA verfügt.

Durch die Erniedrigung oder Hemmung der Expression der vorstehend beschriebenen DNA-Sequenzen, kann die Synthese von TIF-IA bzw. verwandten Proteinen verringert oder eliminiert werden, was beispielsweise bei den in der Einleitung beschriebenen Krankheitszuständen wünschenswert ist. Daher betrifft eine weitere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eine Antisense-RNA, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie zu den vorstehenden DNA-Sequenzen komplementär ist und die Synthese des von diesen DNA-Sequenzen codierten TIF-IA verringern oder hemmen kann und ein Ribozym, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es zu den vorstehenden DNA-Sequenzen komplementär ist und an die von diesen DNA-Sequenzen transkribierte RNA spezifisch binden und diese spalten kann, wodurch die Synthese des von diesen DNA-Sequenzen codierten TIF-IA ebenfalls verringert oder gehemmt wird. Vorzugsweise sind diese Antisense-RNAs und Ribozyme zu einer codierenden Region der mRNA komplementär. Der Fachmann ist in der Lage, ausgehend von den offenbarten DNA-Sequenzen, geeignete Antisense-RNAs herzustellen und anzuwenden. Geeignete Vorgehensweisen sind beispielsweise in EB-B1 0 223 399 oder EP-A1 0 458 beschrieben. Ribozyme sind RNA-Enzyme und

bestehen aus einem einzelnen RNA-Strang. Diese können andere RNAs intermolekular spalten, beispielsweise die von den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen transkribierten mRNAs. Diese Ribozyme müssen prinzipiell über zwei Domänen verfügen, (1) eine katalytische Domäne und, (2) eine Domäne, die zu der Ziel-RNA komplementär ist und an diese binden kann, was die Voraussetzung für eine Spaltung der Ziel-RNA ist. Ausgehend von in der Literatur beschriebenen Vorgehensweisen ist es inzwischen möglich, spezifische Ribozyme zu konstruieren, die eine gewünschte RNA an einer bestimmten, vorgewählten Stelle schneiden (siehe beispielsweise Tanner et al., in: Antisense Research and Applications, CRC Press, Inc. (1993), 415-426). Vorzugsweise weisen die erfindungsgemäßen Antisense-RNAs bzw. Ribozyme einen Bereich auf, der zu der Ziel-DNA über eine Länge von 12 Nucleotiden, bevorzugt 15 Nucleotiden, stärker bevorzugt 20 Nucleotiden komplementär ist.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen bzw. die die vorstehend beschriebenen Antisense-RNAs oder Ribozyme codierenden DNAs können auch in einen Vektor bzw. Expressionsvektor inseriert werden. Somit umfaßt die vorliegende Erfindung auch diese DNA-Sequenzen enthaltende Vektoren bzw. Expressionsvektoren. Die Bezeichnung "Vektor" bezieht sich auf ein Plasmid (pUC18, pBR322, pBlueScript etc.), auf ein Virus oder ein anderes geeignetes Vehikel. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße DNA-Molekül im Vektor mit regulatorischen Elementen funktionell verknüpft, die dessen Expression in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszellen erlauben. Solche Vektoren enthalten neben den regulatorischen Elementen, beispielsweise einem Promotor, typischerweise einen Replikationsursprung und spezifische Gene, die die phänotypische Selektion einer transformierten Wirtszelle erlauben. Zu den regulatorischen Elementen für die Expression in Prokaryoten, beispielsweise E.coli, zählen der lac-, trp-Promotor oder T7-Promotor, und für die Expression in Eukaryoten der AOX1- oder GAL1-Promotor in Hefe und der CMV-, SV40-, RVS-40-Promotor, CMV- oder SV40-Enhancer für die Expression in tierischen Zellen. Weitere Beispiele für



geeignete Promotoren sind der Metallothionein I- und der Polyhedrin-Promotor. Zu geeigneten Expressionsvektoren für E.coli zählen beispielsweise pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8, wobei letzterer bevorzugt ist. Zu den für die Expression in Hefe geeigneten Vektoren zählen pY100 und Ycpad1, für die Expression in Säugerzellen pMSXND, pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4. Zu den erfindungsgemäßen Expressionsvektoren zählen auch von Baculovirus abgeleitete Vektoren für die Expression in Insektenzellen, beispielsweise pAcSGHisNT-A.

Allgemeine, auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren können zur Konstruktion von Expressionsvektoren, die die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen und geeignete Kontrollsequenzen enthalten, verwendet werden. Zu diesen Verfahren zählen beispielsweise in vitro-Rekombinationstechniken, synthetische Verfahren, sowie in vivo-Rekombinationsverfahren, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., supra, beschrieben sind. Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können auch in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid codierenden DNA inseriert werden, so daß die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen beispielsweise in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden können.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die vorstehend beschriebenen Vektoren enthaltende Wirtszellen. Zu diesen Wirtszellen zählen Bakterien (beispielsweise die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM109, BL21 und SG13009), Hefe, vorzugsweise S. cerevisiae, Insektenzellen, vorzugsweise sf9-Zellen, und Tierzellen, vorzugsweise Säugerzellen. Bevorzugte Säugerzellen sind CHO-, VERO-, BHK-, HeLa-, COS-, MDCK, 293- und WI38-Zellen. Verfahren zur Transformation dieser Wirtszellen, zur phänotypischen Selektion von Transformanten und zur Expression der erfindungsgemäßen DNA-Moleküle unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Vektoren sind auf dem Fachgebiet bekannt.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner einen von den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen codierten RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA bzw. Proteine mit dessen biologischer Aktivität sowie Verfahren zu deren rekombinanten Herstellung unter Verwendung der erfindungsgemäßen Expressionsvektoren. Das erfindungsgemäße Verfahren umfaßt die Kultivierung der vorstehend beschriebenen Wirtszellen unter Bedingungen, die die Expression des Proteins (bzw. Fusionsproteins) erlauben (vorzugsweise stabile Expression), und die Gewinnung des Proteins aus der Kultur oder aus den Wirtszellen. Dem Fachmann sind Bedingungen bekannt, transformierte bzw. transfizierter Wirtszellen zu kultivieren. Geeignete Reinigungsverfahren (beispielsweise präparative Chromatographie, Affinitätschromatographie, beispielsweise Immunoaffinitätschromatographie, HPLC etc.) sind ebenfalls allgemein bekannt.

Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft Liganden gegen die vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Proteine (TIF-IA oder verwandte Proteine). Diese Liganden können beispielsweise in diagnostischen Assays verwendet werden oder für therapeutische Zwecke, wobei es nach Anlagerung an das Zielmolekül, d.h. TIF-IA, zu dessen Hemmung kommt, d.h. es kann nicht mehr an sein Ziel, Pol I, binden und diese somit nicht mehr aktivieren. Verfahren zur Isolierung bzw. Synthese solcher Liganden sind dem Fachmann bekannt. Beispielsweise können möglicherweise nützliche aktivitätshemmende Verbindungen in Extrakten von natürlichen Produkten als Ausgangsmaterial gescreent werden. Solche Extrakte können beispielsweise aus Pilzen, Actinomyceten, Algen, Insekten, Protozoen, Pflanzen und Bakterien stammen.

Vorzugsweise handelt es sich bei dem erfindungsgemäßen Liganden um einen Antikörper oder ein Fragment davon. Diese Antikörper können monoclonale, polyclonale oder synthetische Antikörper sein oder Fragmente davon. In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff "Fragment" alle Teile des monoclonalen Antikörpers (z.B. Fab-, Fv- oder "single chain Fv"-Fragmente),

welche die gleiche Epitopspezifität wie der vollständige Antikörper aufweisen. Die Herstellung solcher Fragmente ist dem Fachmann bekannt. Vorzugsweise handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Antikörpern um monoclonale Antikörper. Die erfindungsgemäßen Antikörper können gemäß Standardverfahren hergestellt werden, wobei vorzugsweise der von den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen codierte TIF-IA oder ein synthetisches Fragment davon als Immunogen dienen. Verfahren zur Gewinnung monoclonaler Antikörper sind dem Fachmann bekannt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der genannte monoclonale Antikörper ein aus einem Tier (z.B. Maus) stammender Antikörper, ein humanisierter Antikörper oder ein chimärer Antikörper oder ein Fragment davon. Chimäre, menschlichen Antikörper ähnelnde oder humanisierte Antikörper besitzen eine herabgesetzte potentielle Antigenität, jedoch ist ihre Affinität gegenüber dem Ziel nicht herabgesetzt. Die Herstellung von chimären und humanisierten Antikörpern bzw. von den menschlichen Antikörpern ähnelnden Antikörpern wurde ausführlich beschrieben (siehe beispielsweise Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 10029, und Verhoeyan et al., Science 239 (1988), 1534). Humanisierte Immunglobuline weisen variable Grundgerüstbereiche auf, die im wesentlichen von einem humanen Immunglobulin stammen (mit der Bezeichnung Akzeptor-Immunglobulin) und die Komplementarität der determinierenden Bereiche, die im wesentlichen von einem nicht-menschlichen Immunglobulin (z.B. von der Maus) stammen (mit der Bezeichnung Donor-Immunglobulin). Die (der) konstante(n) Bereich(e) stammt (stammen), falls vorhanden, auch im wesentlichen von einem menschlichen Immunglobulin. Bei der Verabreichung an menschliche Patienten bieten humanisierte (sowie die menschlichen) Antikörper eine Reihe von Vorteilen gegenüber Antikörpern von Mäusen oder anderen Spezies: (a) das menschliche Immunsystem sollte das Grundgerüst oder den konstanten Bereich des humanisierten Antikörpers nicht als fremd erkennen und daher sollte die Antikörperantwort gegen einen solchen injizierten Antikörper geringer ausfallen als

gegen einen vollständig fremden Maus-Antikörper oder einen partiell fremden chimären Antikörper; (b) da der Effektorbereich des humanisierten Antikörpers menschlich ist, interagiert er besser mit anderen Teilen des menschlichen Immunsystems, und (c) injizierte humanisierte Antikörper weisen eine Halbwertszeit auf, die im wesentlichen zu der von natürlich vorkommenden menschlichen Antikörpern äquivalent ist, was es erlaubt, kleinere und weniger häufige Dosen im Vergleich zu Antikörpern anderer Spezies zu verabreichen.

Die erfindungsgemäßen Antikörper können beispielsweise auch zur Immunpräzipitation des erfindungsgemäßen TIF-IA, zur Isolierung verwandter Proteine aus cDNA-Expressionsbanken oder für diagnostische Zwecke (siehe unten) verwendet werden. Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Hybridom, das den vorstehend beschriebenen monoclonalen Antikörper erzeugt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Antagonisten für TIF-IA bzw. damit verwandte Proteine. Diese erlauben in vivo ebenfalls eine Hemmung der rRNA-Transkriptionsrate. Zu den möglichen Antagonisten zählen Peptide, die dadurch gewonnen werden können, daß beispielsweise Oligopeptide mit nach dem Zufallsprinzip erzeugten Sequenzen gescreent werden, um so TIF-IA Inhibitoren auffinden zu können. Solche Peptide können direkt als Wirkstoffe verwendet werden, oder um die Orientierung oder Lage einer funktionellen Gruppe aufzufinden, die TIF-IA Aktivität hemmen kann, was wiederum zum Entwurf und dem Austesten eines inhibitorischen kleinen Moleküls führt, oder wobei das Peptid das Rückgrat für chemische Modifizierung wird, die dessen pharmakologischen Verwendungsmöglichkeiten steigern. Bei dem Peptid kann es sich um strukturelle Imitatoren handeln, es können aber auch Molekülmodulierungsprogramme verwendet werden, um Imitatoren - basierend auf der charakteristischen Sekundär- und/oder Tertiärstruktur von TIF-IA - zu entwerfen. Solche strukturellen Imitatoren können dann in vivo als TIF-IA Inhibitoren verwendet werden. Zu den als Antagonisten

wirksamen Verbindungen zählen auch beispielsweise inaktive TIF-IA Moleküle. Wenn diese in ausreichend hoher Konzentration exprimiert bzw. verabreicht werden, führt dies zur Verarmung an notwendigen aktiven TIF-IA Molekülen und dadurch fungieren diese als TIF-IA Antagonisten.

Die vorliegende Erfindung erlaubt auch die Durchführung therapeutischer Maßnahmen bei den vorstehend diskutierten Störungen der Zellproliferation bzw. den damit in Zusammenhang stehenden Erkrankungen, d.h. die vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, Antisense-RNAs, Ribozyme, Liganden und Antagonisten können auch zur Herstellung eines Arzneimittels, beispielsweise zur Kontrolle der Expression des TIF-IA (oder des damit verwandten Proteins) oder zum Austausch einer mutierten Form des Gens gegen eine funktionelle Form verwendet werden, somit beispielsweise einerseits zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention oder der Behandlung von Erkrankungen, die mit einer erhöhten Zellproliferation assoziiert sind oder zur Hemmung der Zellproliferation, insbesondere Tumorerkrankungen, andererseits zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention oder der Behandlung von Erkrankungen, die mit einer verringerten Zellproliferation assoziiert sind oder zur Stimulation der Zellproliferation, beispielsweise zur Förderung der Geweberegeneration. Beispielsweise kann der erfindungsgemäße TIF-IA in Säuger, insbesondere den Menschen, durch übliche Maßnahmen eingebracht werden. Hierzu kann es günstig sein, das Protein an ein vom jeweiligen Körper nicht als fremd angesehenes Protein, z.B. Transferrin oder Rinderserumalbumin (BSA), zu koppeln. Auch kann eine erfindungsgemäße DNA-Sequenz, Antisense-RNA oder Ribozym in Säuger, insbesondere den Menschen, eingebracht und exprimiert werden. Mit einem erfindungsgemäßen Liganden, beispielsweise einem monoclonalen Antikörper, kann die Expression von TIF-IA bzw. der verwandten Proteine kontrolliert und reguliert werden. Antagonisten für TIF-IA können ebenfalls dazu verwendet werden, um so die Wirkung von aktivem TIF-IA abzuschwächen oder ganz zu blockieren.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Arzneimittel, das die vorstehend beschriebenen DNA-Sequenzen, Antisense-RNA, das Ribozym, den Expressionsvektor, das erfindungsgemäße Protein, den Liganden oder Antagonisten enthält. Dieses Arzneimittel enthält gegebenenfalls zusätzlich einen pharmazeutisch verträglichen Träger. Geeignete Träger und die Formulierung derartiger Arzneimittel sind dem Fachmann bekannt. Zu geeigneten Trägern zählen beispielsweise Phosphat-gepufferte Kochsalzlösungen, Wasser, Emulsionen, beispielsweise Öl/Wasser-Emulsionen, Netzmittel, sterile Lösungen etc. Die Verabreichung der Arzneimittel kann oral oder parenteral erfolgen. Zu den Verfahren für die parenterale Verabreichung gehören die topische, intra-arterielle, intramuskuläre, subkutane, intramedulläre, intrathekale, intraventrikuläre, intravenöse, intraperitoneale oder intranasale Verabreichung. Die geeignete Dosierung wird von dem behandelnden Arzt bestimmt und hängt von verschiedenen Faktoren ab, beispielsweise von dem Alter, dem Geschlecht, dem Gewicht des Patienten, dem Stadium der Erkrankung, der Art der Verabreichung etc.

Vorzugsweise werden die vorstehend beschriebenen DNA-Sequenzen in einen für die Gentherapie geeigneten Vektor inseriert, beispielsweise unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors, und in die Zellen eingeschleust. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der die vorstehend beschriebenen DNA-Sequenzen enthaltende Vektor ein Virus, beispielsweise ein Adenovirus, Vaccinia-Virus oder Adenovirus. Besonders bevorzugt sind Retroviren. Beispiele für geeignete Retroviren sind MoMuLV, HaMuSV, MuMTV, RSV oder GaLV. Für Zwecke der Gentherapie können die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen auch in Form von kolloidalen Dispersionen zu den Zielzellen transportiert werden. Dazu zählen beispielsweise Liposomen oder Lipoplexe (Mannino et al., Biotechniques 6 (1988), 682). Diese Gentherapie kann sowohl für die Erhöhung der Proliferationsrate der Zellen (beispielsweise mit einem Vektor, der das Gen für aktiven TIF-IA enthält) als auch für eine Verringerung der Proliferationsrate (mit einem Vektor,

der ein Gen für ein Ribozym, eine Antisense-RNA oder eine inaktive Form von TIF-IA ("knock-out") enthält) Anwendung finden.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es auch, Störungen der TIF-IA Expression bzw. Zellproliferation auf genetischer Ebene zu untersuchen. Mit einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz bzw. davon abgeleiteten Sonden oder Primern kann in Säugern, insbesondere dem Menschen, festgestellt werden, ob sie ein verändertes TIF-IA Gen enthalten, das zu einer mutierten Form des Proteins führt, die nicht länger biologisch aktiv ist, oder ob beispielsweise TIF-IA zu gering oder zu stark exprimiert wird. Dazu kann der Fachmann übliche Verfahren, wie Reverse Transkription, PCR, LCR, Hybridisierung und Sequenzierung durchführen. Auch die erfindungsgemäßen Liganden, beispielsweise die Antikörper oder Fragmente davon, eignen sich für die Diagnostik, d.h. beispielsweise zum Nachweis des Vorhandenseins und/oder der Konzentration des TIF-IA, einer verkürzten oder verlängerten Form dieses Proteins etc., in einer Probe. Die Antikörper können beispielsweise in Immunoassays in Flüssigphase oder an einen festen Träger gebunden werden. Dabei können die Antikörper auf verschiedene Art und Weise markiert sein. Geeignete Marker und Markierungsverfahren sind auf dem Fachgebiet bekannt. Beispiele für Immunassays sind ELISA und RIA.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Diagnoseverfahren zum Nachweis einer gestörten TIF-IA Expression, bei dem man eine Probe mit der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz oder dem erfindungsgemäßen Liganden, beispielsweise einem monoclonalen Antikörper oder einem Fragment davon in Berührung bringt und sodann direkt oder indirekt bestimmt, ob sich die Konzentration, Länge und/oder Sequenz des RNA Polymerase I Transkriptionsfaktors TIF-IA oder der diesen codierenden mRNA im Vergleich zu einer Kontrollprobe unterscheiden. Die für dieses Diagnoseverfahren verwendbaren Sonden umfassen auch auf den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen basierende Primer, beispielsweise für eine PCR.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung einen diagnostischen Kit zur Durchführung des vorstehend beschriebenen Diagnoseverfahrens, der eine erfindungsgemäße DNA-Sequenz oder den vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen Liganden, beispielsweise einen monoclonalen Antikörper oder das Fragment davon, enthält. Je nach Ausgestaltung des diagnostischen Kits können die DNA-Sequenz bzw. der Ligand immobilisiert sein.

#### **Kurze Beschreibung der Figuren:**

**Fig. 1:** Vergleich der Aminosäuresequenzen von rrn3p aus *S.cerevisiae* (rrn3p) und homologen Proteinen aus *S. pombe* (pombe), *C. elegans* (cec36e8) und *Arabidopsis thaliana* (ATAC)

**Fig. 2:** humane cDNA-Sequenz TIF-IA und abgeleitete Aminosäuresequenz

#### **Fig. 3: Northern-Blot-Analyse**

Zum Nachweis von TIF-IA-Sequenzen wurden aus verschiedenen Geweben extrahierte RNAs (Clontech: 7760-1) mit radioaktiv markierter TIF-IA cDNA (Clon pBS-hTIF-IA) hybridisiert und anschließend eine Autoradiographie erstellt.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

#### **Beispiel 1: Identifizierung einer TIF-IA cDNA-Sequenz**

Es sind Genprodukte von Hefegenen bekannt, die für die Pol I Transkription in *S. cerevisiae* erforderlich sind. Bei einem der Genprodukte, rrn3p, handelt es sich um ein 72 kDa Protein, das mit der drittgrößten Untereinheit von Pol I (RPA49) assoziiert ist. Dieses scheint in stationären Hefekulturen entweder nicht vorhanden oder transkriptionell inaktiv zu sein. Solche Eigenschaften charakterisieren auch TIF-IA. Der Anmelder hat daher vermutet, daß es sich bei rrn3p und TIF-IA um funktionell homologe Proteine handeln könnte. Er hat daher eine umfangreiche Suche in verschiedenen Datenbanken



durchgeführt, um Informationen über die mögliche Existenz eines *rrn3p*-homologen Proteins in anderen Organismen zu erhalten. Mit Hilfe des "BLAST"-Programms hat er Homologien zwischen *rrn3p* aus *S.cerevisiae* und einem Genprodukt aus *S. pombe* (Swissprot ID YAQA\_SCHPO), einem Genprodukt aus *Arabidopsis thaliana* (PID:g3132470) und einem Genprodukt aus *C. elegans* (PID:g3924707) identifiziert. Die Vergleiche der Aminosäuresequenzen sind in Fig. 1 gezeigt. Diese wurden nach dem Algorithmus von Vingron und Argos, J.Mol.Biol.218 (1991), 33-43, durchgeführt und zeigen in Großbuchstaben die konservierten Bereiche. Hieraus konnte folgende Konsensussequenz für den C-terminalen Bereich abgeleitet werden:

FNSLFKSFENTVLNTYKSRYTQFLIFYACSLDPENC DXFLSKLVEVFLSSNKAXAKRQASAR  
YIGSYVARAKTLNKDTIPXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXERHQIFYSGCQAIFYV  
FCFRMREFLDVDRFRSQETRXXXERIVMSKLNPLKYCSPNVVLEFARIAKELGLFYVSSII  
EFNDLLRS

Mit dieser "Core"-Sequenz hat der Anmelder humane ESTs und genomische Sequenzbanken durchsucht. Dabei wurden drei Homologie-Bereiche in der genomischen Sequenz eines "BAC"-Clons (CIT987SK-270G1, "Genbank"-Zugangsnummer AF001549) gefunden. Es wurde in einem Bereich von ca. 10.000 Basen, der die gefundenen Homologien enthält, mit dem Programm "GENSCAN" eine Exonvorhersage berechnet, die die drei gefundenen homologen Bereiche in der konservierten Region als codierende Sequenzen bestätigte. Ausgehend von dieser Sequenz wurde das 5'Ende des zu *rrn3p* homologen Gens mit einem 5'RACE aus einer humanen fötalen cDNA-Bank bestimmt. Durch "gene walking", gezielte PCR-Strategien, Hybridisierungstechniken, 3'RACE, Sequenzierung und Zusammenfügung der einzelnen Genabschnitte wurde letztlich ein cDNA-Clon erhalten, der für TIF-IA mit einem Molekulargewicht von etwa 75 kDa codiert. Die Nucleinsäuresequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz sind in Fig. 2 dargestellt. Dieser cDNA-Clon wurde mit pBS-hTIF-IA bezeichnet. Er wurde bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) unter DSM 12707 am 25.2.1999 hinterlegt.

**Beispiel 2: Nachweis von TIF-IA-Sequenzen in Geweben**

Käufliche Filter (Clontech: 7760-1), die RNAs von Herz, Hirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas enthalten, wurden einer Hybridisierung mit [ $\alpha^{32}$ P] dCTP markierter pBS-hTIF-IA cDNA von Beispiel 1 unterworfen. Die Hybridisierung erfolgte bei 65° C in 5 x SSPE, 1 % SDS, 1 x Denhardts-Lösung. Nach der Hybridisierung wurde zuerst mit 2 x SSC, 1 % SDS und danach mit 0,2 x SSC bei 65° C gewaschen.

Es zeigte sich, daß TIF-IA-Sequenzen in den verschiedensten Geweben unterschiedlich stark exprimiert werden.

**Beispiel 3: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen RNA Polymerase I Transkriptionsfaktors TIF-IA.**

Die DNA von Fig. 2 wurde mit BAMHI-Linkern versehen, mit BamHI nachgespalten und in den mit BamHI gespaltenen Expressionsvektors pQE-8 (Qiagen) inseriert. Es wurde das Expressionsplasmid pQE-8/TIF-IA erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und dem erfindungsgemäßen Tif-IA von Fig. 2 (C-Terminuspartner). pQE-8/TIF-IA wurde zur Transformation von E.coli SG 13009 (vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien wurden in einem LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60 µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wurde eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wurde mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Qiagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wurde in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wurde das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes (Fusions)protein in

hochreiner Form hergestellt werden kann.

**Patentansprüche**

1. DNA-Sequenz, kodierend für einen RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA mit der in Fig. 2 gezeigten Aminosäuresequenz.
2. DNA-Sequenz nach Anspruch 1, wobei sie die in Fig. 2 gezeigte Nucleinsäuresequenz umfaßt.
3. DNA-Sequenz, kodierend für ein Protein mit den biologischen Eigenschaften eines RNA Polymerase I Transkriptionsfaktors TIF-IA, wobei die DNA-Sequenz
  - (a) sich von der DNA-Sequenz von Anspruch 2 in der Codonsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes unterscheidet;
  - (b) mit der DNA-Sequenz von Anspruch 2 oder 3(a) hybridisiert; oder
  - (c) ein Fragment, eine allelische Variante oder eine andere Variante der DNA-Sequenz von Anspruch 2, 3(a) oder 3(b) ist.
4. Ribozym, wobei es zu der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3 komplementär ist und an die von dieser DNA-Sequenz transkribierte RNA spezifisch binden und diese spalten kann, wodurch die Synthese des von dieser DNA-Sequenz codierten Proteins verringert oder gehemmt wird.
5. Antisense-RNA, wobei sie zu der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3 komplementär ist und an die von dieser DNA-Sequenz transkribierte RNA spezifisch binden kann, wodurch die Synthese des von dieser DNA-Sequenz codierten Proteins verringert oder gehemmt wird.
6. Expressionsvektor, wobei er die DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3 enthält oder für das Ribozym nach Anspruch 4 oder die Antisense-RNA nach Anspruch 5

kodiert.

7. Wirtszelle, enthaltend den Expressionsvektor nach Anspruch 6.
8. RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA oder Protein mit dessen biologischer Aktivität, das (der) durch die DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3 kodiert wird.
9. Verfahren zur Herstellung eines RNA Polymerase I Transkriptionsfaktors TIF-IA oder eines Proteins mit dessen biologischer Aktivität nach Anspruch 8, das die Züchtung der Wirtszelle nach Anspruch 7 unter geeigneten Bedingungen und die Gewinnung des Proteins aus der Zelle oder dem Zuchtmedium umfaßt.
10. Ligand, der an den RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA oder ein Protein mit dessen biologischer Aktivität nach Anspruch 8 bindet.
11. Ligand nach Anspruch 10, der ein Antikörper oder ein Fragment davon ist.
12. Antagonist, der die Wirkung des RNA Polymerase I Transkriptionsfaktors TIF-IA oder eines Proteins mit dessen biologischer Aktivität nach Anspruch 8 abschwächt oder blockiert.
13. Verwendung der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3, des Expressionsvektors nach Anspruch 6, des RNA Polymerase I Transkriptionsfaktors TIF-IA oder eines Proteins mit dessen biologischer Aktivität nach Anspruch 8 zur Prävention oder Behandlung von Erkrankungen, die mit einer verringerten Zellproliferation assoziiert sind oder zur Stimulation der Zellproliferation.

14. Verwendung der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3, des Expressionsvektors nach Anspruch 6, des RNA Polymerase I Transkriptionsfaktors TIF-IA oder eines Proteins mit dessen biologischer Aktivität nach Anspruch 8 zur Förderung der Geweberegeneration.
15. Verwendung des Ribozyms nach Anspruch 4, der Antisense-RNA nach Anspruch 5, des Expressionsvektors nach Anspruch 6, des Liganden nach Anspruch 10 oder des Antagonisten nach Anspruch 12 zur Prävention oder Behandlung von Erkrankungen, die mit einer erhöhten Zellproliferation assoziiert sind, oder zur Hemmung der Zellproliferation.
16. Verwendung des Ribozyms nach Anspruch 4, der Antisense-RNA nach Anspruch 5, des Expressionsvektors nach Anspruch 6, des Liganden nach Anspruch 10 oder des Antagonisten nach Anspruch 12 zur Krebstherapie.
17. Diagnoseverfahren zum Nachweis einer eventuell gestörten TIF-IA Expression, bei dem man eine Probe mit der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder dem Liganden nach Anspruch 10 in Berührung bringt und sodann direkt oder indirekt bestimmt, ob sich die Konzentration, Länge und/oder Sequenz des RNA Polymerase I Transkriptionsfaktors TIF-IA oder der diesen codierenden mRNA im Vergleich zu einer Kontrollprobe unterscheiden.
18. Diagnostischer Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 17, der die DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3 und/oder den Liganden nach Anspruch 10 enthält.

```

mmafentskrppqdfvapidqkkrkvqfsdstglvtlqpeeikdevfsaa----- rrn3p
-----mpsiisstnpqyinkcvnngtmasstnvpdrvtvgksfassvskndgrlmq pombe
-----mkrtanapklspkhesesdpkkvkleeeakptvnqa cec36e8
-----mgavelmsdpsslctvenyvdnvd ATAC

-mysrfvksalddldkndstqigiiangvalpskNP----erINDKLNLLDILSSNIN rrn3p
qmlrafvnkald--dkaegr.fagyedlrqfaakSD--tkdapSSLQLQNLLSALTNCNVS pombe
ptgreivenylkgdvtaavlyrkicnaletfeqwES----eapKIQLLDQFLNIADAMEA cec36e8
lsdcqlvqtrkaltsvktgdsdlysemvgvmarDikefkdpdVVAQLETVLKALSGAVA ATAC

RIESsrgtflIQSIINFekWWE-LPPHTLSXYIYFIkilcssipkwwqdvsmilvscfil rrn3p
RLDSsnss-LVMSVLDS--VWVsRDESFVRCYTRFLgnlisaqsrylplvmmlighml- pombe
RTET----LVKRLLSL--RWDKIPGSVIERFRNFLcelairhlctfeevysavverlv cec36e8
CIDVlhhqkLLSALFRMk-LWD-HRPDVM DALVNLVislavtsgkyldscnlmivsnfvp ATAC

pi-----KQTVch-----HDMLKYFLRMIPSSMGFIDTYLAKFFPNKNDR rrn3p
-----yrpdSLAI-----hyehaHMAKLYLELVPRHSFLYSSILEEFYKDES L pombe
qisvteetgvvtlILTEkvqnehfemahHIISSVLCFPLSARALLKCVKRVMPHFTRPS cec36e8
ppwvvnmls-hsrILNKKi--dvlsrvHAALLKISILVPLTPSRLVPM LFQMPKMHKKD ATAC

RKLVNYSNLLKLRGYCSE--LGFQIWSLLIEKIIISIDVELqneldeiddvdddleev rrn3p
LAQMTYISNVLSICEYVPS--IKGPVLHAIIDKIIQIDVEIqvevddde----- pombe
VTVAGYMRNLILMQXYIPAS-ISKDVWEAVFERLAKDDTHN-----w cec36e8
HSIVIYVESLLKLENSSIGqvGGSMLGMVMERLRDL DVSRqnmliqlrs-----lei ATAC

dleddddldddsgddddencgrsneeLrSgaadgsqsdse dm----- rrn3p
--eedevvtdddGdtsnadsevitastLyE----- pombe
kceqneemsksp-----rlfalnddiliEevvegntndsedvtpeqlerkgemiqyld cec36e8
ewddipqddssRgmfdme-----L-Edaaegtmdgdclpvgplkq----- ATAC

---diiegm dgteeynvELTQGIKELSTKLDSILtLVSTHVEEqvtpeslesgegvGVF rrn3p
rhtaissesstiltppSLTDT-RQLMQQLDQLLyTLFSYLDsnlksrdr--yLVY pombe
svctdvitfirssvdseiDEENG-NERTKLNDKWL-RNFKITGDKvlpke-----KLF cec36e8
-----DTSDG-SIVSKLLDKLmvVAFENLEScqndgrld----QVF ATAC

NTLTTLFKTHVLPTYYTSTRSIQYIMFHVSSQOQLEL-MDSFLVTLIDIsfavneaaekki s rrn3p
NSLIKSFVNTVLKTRFCRYTQFLIFWASQLDPEF-TDIFLGVLTEVcl---dpsqpytlr pombe
DTFLECLESTMLNATHVQVVSFIWLYFCSLSQEY-EKKMLEHLWQvtirmprapadarks cec36e8
ESLFKSFENFILNTYKSKFTQFLIFYACSLDPENCGVKFASKLVEI----- ATAC

---lqylgsyiarakklrqtqiifvasyltswlnRYVIEREEVDQ-rggmERFKHFYAA rrn3p
lsgamyigsyvarakalekntiqiivnmtrwveAYLDQCENELSDdl--lSKHSVFYAI pombe
qgaasyalaflarakvkkstafwleevyiwlrHYVDQFGSGSSQilpglQRHGTfYSV cec36e8
-----flssnkhvatrqasrlidcev---GYCRTCNDDTRP-----EAHQIFFSG ATAC

FQALCYIFCFRHNIFRDTDGN-----weceldkFFQRMVISKFNPLKFCNENVMMLM rrn3p
NQSIFFYFCFRWRRELCVSDSEsmepnpnewipgle-ILHRSVLSRLNPLRYCSPNIVLQ pombe
SQAFFLVFAFRYKEFVKXDMletirt-----wGVGVVHSPLEPLKYVSKPVARC cec36e8
COAIMYVLCFRMRSILDVPRFRsqlt-----PLESILMHKLNPLMVCLPSVVAE ATAC

FARIAQQESVAYCFSiiennnnneRLRGIIGKadsdkkensaqantssswslatrqfid rrn3p
FAKVANHLNFMVYSii---eqNRKGIFRE-----gfdt pombe
FSAITRSLQLVYCNHii---PIEEVQRP----- cec36e8
FLRQAKEGGLFIVSDsf-ifddlLESELSRAfgg-----fer ATAC

LQSYFFPYDPLFLKNYKILMKEYY-----IEWSEASGEYESDGSDD---- rrn3p
MDAYFFPDOPYRLTKSSIIVQPFY-----NEWQIIPGLDDDEEEDtdye pombe
FDMFPFDCYHLKESKFMTPLMrkfplaedstltkalCWNAAATADKSESAEavsss cec36e8
LDTFPPFDPCLLKSSNSFISPNF-----IYWSMVKATYDEDDDDndaev ATAC

----- rrn3p
sstvmlges-----pf----- pombe
egldfldeddammmgssgyrertfscgqs-----slinysatpglqtfnv---- cec36e8
ivngdedddeadldyalnkrsitpkhsfknknerdrllrmpsrirpstspesl---- ATAC

```

Fig 1: Sequenzalignment

1 GGAGCGGCCGCCAGGTGCGGTGCGGTTAGTTCGGCCCAATGGCGGCACCGCTGCTTCAC  
M A A P L L H -  
61 ACGCGTTTGCCGGGAGATGCGGCCGCTTCGTCTCTGCAGTTAAGAAGCTGGGCGCGTCC  
T R L P G D A A A S S S A V K K L G A S -  
120 AGGACTGGGATTTCAAATATGCGTGCATTAGAGAATGACTTTTTCAATTCTCCCCAAGA  
R T G I S N M R A L E N D F F N S P P R -  
181 AAAACTGTTGCGTTTGGTGGAACTGTGACAGAAGTCTTGCTGAAGTACAAAAGGGTGAA  
K T V R F G G T V T E V L L K Y K K G E -  
241 ACAAATGACTTTGAGTTGTTGAAGAACCAGCTGTTAGATCCAGACATAAAGGATGACCAG  
T N D F E L L K N Q L L D P D I K D D Q -  
301 ATCATCAACTGGCTGCTAGAATTCCGTTCTTCTATCATGTACTTGACAAAAGACTTTGAG  
I I N W L L E F R S S I M Y L T K D F E -  
361 CAACTTATCAGTATTATATTAAGATTGCCTTGGTTGAATAGAAGTCAAACAGTAGTGGA  
Q L I S I I L R L P W L N R S Q T V V E -  
421 GAGTATTTGGCTTTTCTTGGTAATCTTGATCAGCACAGACTGTTTTCCTCAGACCGTGT  
E Y L A F L G N L V S A Q T V F L R P C -  
481 CTCAGCATGATTGCTTCCCATTTTGTGCTCCCCGAGTGATCATTAAAGGAAGGCGATGTA  
L S M I A S H F V P P R V I I K E G D V -  
541 GATGTTTCAGATTCTGATGATGAAGATGATAATCTTCTGCAAATTTTGACACATGTCAC  
D V S D S D D E D D N L P A N F D T C H -  
601 AGAGCCTTGCAAATWATAGCAAGATATGTACCATCGACACCGTGGTTTCTCATGCCAATA  
R A L Q I I A R Y V P S T P W F L M P I -  
661 CTGGTGAAAAAATTTCCATTTGTTTCGAAAAATCAGAGAGAACTGGAATGTTACGTTTCAT  
L V E K F P F V R K S E R T L E C Y V H -  
721 RACTTACTAAGGATTAGTGTATATTTTCCAACCTTGAGGCATGAAATCTGGAGCTTATT  
? L L R I S V Y F P T L R H E I L E L I -  
781 ATTGAAAAACTACTCAAGTTGGATGTGAATGCATCCCGCAGGGTATTGAAGATGCTGAA  
I E K L L K L D V N A S R Q G I E D A E -  
841 GAAACAGCAACTCAAATTTGTTGGTGGGACAGATTCCACGGAAGGATTGTTTAATATGGAT  
E T A T Q T C G G T D S T E G L F N M D -  
901 GAAGATGAAGAACTGAACATGAACAAAGGCTGGTCTGAAACGGCTCGACCAGATGGTG  
E D E E T E H E T K A G P E R L D Q M V -  
961 CATCCTGTAGCCGAGCGCCTGGACATCCTGATGTCTTTGGTTTTGCTCTACATGAAGGAT  
H P V A E R L D I L M S L V L S Y M K D -  
1021 GTCTGCTATGTAGATGGTAAGGTTGATAACGGCAAAACAAAGGATCTATATCGCGACCTG  
V C Y V D G K V D N G K T K D L Y R D L -  
1081 ATAAACATCTTTGACAACTCCTGTTGCCACCCATGCCTCCTGCCATGTACAGTTTTTC  
I N I F D K L L L P T H A S C H V Q F F -  
1141 ATGTTTTACCTCTGTAGTTTCAAATTTGGGATTTCGAGAGGCATTTTGGAAACATCTCTGG  
M F Y L C S F K L G F A E A F L E H L W -  
1201 AAAAAATTGCAGGACCCAAGTAATCCTGCCATCATCAGGCAGGCTGCTGGAAATTATATT  
K K L Q D P S N P A I I R Q A A G N Y I -  
1261 GGAAGCTTTTTGGCAAGAGCTAAATTTATTCCTCTTATTACTGTAAATCATGCCTAGAT  
G C F E A R A V R V Y V M V V C C V D



FIGUR 2/3 (Fortsetzung)

1321 CTTTTGGTTAACTGGCTGCACATATACCTTAATAACCAGGATTGGGAACAAAGGCATT  
L L V N W L H I Y L N N Q D S G T K A F -

1381 TGCGATGTTGCTCTCCATGGACCATTTTACTCAGCCTGCCAAGCTGTGTTCTACRCCTTT  
C D V A L H G P F Y S A C Q A V F Y ? F -

1441 GTTTTTAGACACAAGCAGCTTTTGAGCGGAAACCTGAAAGAAGGTTGCAGTATCTTCAG  
V F R H K Q L L S G N L K E G L Q Y L Q -

1501 AGTCTGAATTTTGAGCGGATAGTGATGAGCCAGCTAAATCCCCTGAAGATTTGCCTGCCC  
S L N F E R I V M S Q L N P L K I C L P -

1561 TCAGTGGTTAACTTTTTTGCTGCAATCACAAATAAGTACCAGCTCGTCTTCTGCTACACC  
S V V N F F A A I T N K Y Q L V F C Y T -

1621 ATCATTGAGAGGAACAATCGCCAGATGCTGCCAGTCATTAGGAGTACCGCTGGAGGAGAC  
I I E R N N R Q M L P V I R S T A G G D -

1681 TCAGTGCAGATCTGCACAAACCCGCTGGACACCTTCTTCCCCTTTGATCCCTGTGTGCTG  
S V Q I C T N P L D T F F P F D P C V L -

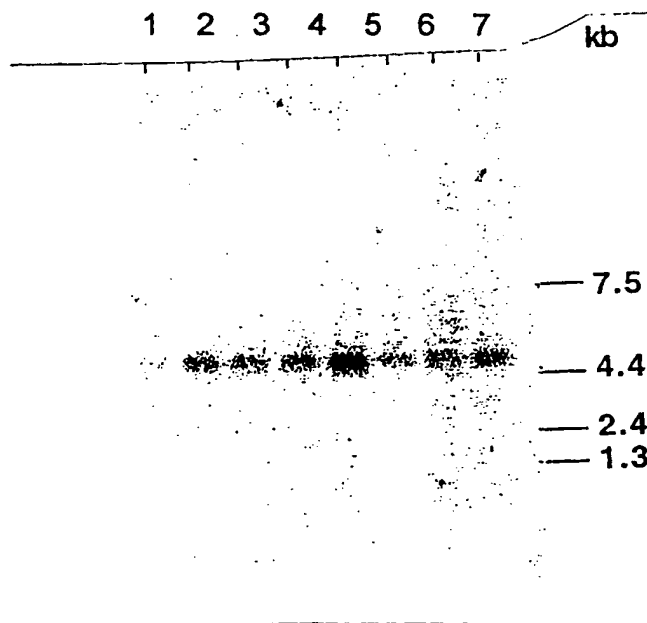
1741 AAGAGGTCAAAGAAATTCATTGATCCTATTTATCAGGTGTGGGAAGACATGAGTGCTGAA  
K R S K K F I D P I Y Q V W E D M S A E -

1801 GAGCTACAGGAGTTCAAGAAACCCATGAAAAAGGACATAGTGGAAAGATGAAGATGATGAC  
E L Q E F K K P M K K D I V E D E D D D -

1861 TTTCTGAAAGGCGAAGTGCCCCAGAATGATACCGTGATTGGGATCACACCAAGCTCCTTT  
F L K G E V P Q N D T V I G I T P S S F -

1921 GACACGCATTTCCGAAGTCCTTCAAGTAGTGTGGGCTCCCCACCCGTGTTGTACATGCAA  
D T H F R S P S S S V G S P P V L Y M Q -

1981 CCCAGTCCCCTCTGACGGCAGAAATTTGTGACTGAGATGTGACATTTGGGATTCCCCATC  
P S P L "

FIGUR 3/3

Spur 1: Herz  
Spur 2: Hirn  
Spur 3: Plazenta  
Spur 4: Lunge  
Spur 5: Leber  
Spur 6: Sk.Muskel  
Spur 7: Niere  
Spur 8: Pankreas

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Deutsches Krebsforschungszentrum
- (B) STRASSE: Im Neuenheimer Feld 280
- (C) ORT: Heidelberg
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 69120

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor  
TIF-1A

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (v) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: DE 199 11 992.9

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2040 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 40..1992

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GGAGCGGCCG CCCAGGTGCG GTCGCGTTAGT TCGGCCCA ATG GCG GCA CCG CTG	54
Met Ala Ala Pro Leu	
1 5	
CTT CAC ACG CGT TTG CCG GGA GAT GCG GCC GCT TCG TCC TCT GCA GTT	102
Leu His Thr Arg Leu Pro Gly Asp Ala Ala Ser Ser Ser Ala Val	
10 15 20	
AAG AAG CTG GGC GCG TCG AGG ACT GGG ATT TCA AAT ATG CGT GCA TTA	150
Lys Lys Leu Gly Ala Ser Arg Thr Gly Ile Ser Asn Met Arg Ala Leu	
25 30 35	
GAG AAT GAC TTT TTC AAT TCT CCC CCA AGA AAA ACT GTT CGG TTT GGT	198
Glu Asn Asp Phe Phe Asn Ser Pro Pro Arg Lys Thr Val Arg Phe Gly	
40 45 50	
GGA ACT GTG ACA GAA GTC TTG CTG AAG TAC AAA AAG GGT GAA ACA AAT	246
Gly Thr Val Thr Glu Val Leu Leu Lys Tyr Lys Lys Gly Glu Thr Asn	
55 60 65	
GAC TTT GAG TTG TTG AAG AAC CAG CTG TTA GAT CCA GAC ATA AAG GAT	294
Asp Phe Glu Leu Leu Lys Asn Gln Leu Leu Asp Pro Asp Ile Lys Asp	
70 75 80 85	

GAC Asp	CAG Gln	ATC Ile	ATC Ile	AAC Asn 90	TGG Trp	CTG Leu	CTA Leu	GAA Glu	TTC Phe 95	CGT Arg	TCT Ser	TCT Ser	ATC Ile	ATG Met 100	TAC Tyr	342
TTG Leu	ACA Thr	AAA Lys	GAC Asp 105	TTT Phe	GAG Glu	CAA Gln	CTT Leu	ATC Ile 110	AGT Ser	ATT Ile	ATA Ile	TTA Leu	AGA Arg 115	TTG Leu	CCT Pro	390
TGG Trp	TTG Leu	AAT Asn 120	AGA Arg	AGT Ser	CAA Gln	ACA Thr	GTA Val 125	GTG Val	GAA Glu	GAG Glu	TAT Tyr	TTG Leu 130	GCT Ala	TTT Phe	CTT Leu	438
GGT Gly	AAT Asn 135	CTT Leu	GTA Val	TCA Ser	GCA Ala	CAG Gln 140	ACT Thr	GTT Val	TTC Phe	CTC Leu	AGA Arg 145	CCG Pro	TGT Cys	CTC Leu	AGC Ser	486
ATG Met 150	ATT Ile	GCT Ala	TCC Ser	CAT His	TTT Phe 155	GTG Val	CCT Pro	CCC Pro	CGA Arg	GTG Val 160	ATC Ile	ATT Ile	AAG Lys	GAA Glu	GGC Gly 165	534
GAT Asp	GTA Val	GAT Asp	GTT Val	TCA Ser 170	GAT Asp	TCT Ser	GAT Asp	GAT Asp	GAA Glu 175	GAT Asp	GAT Asp	AAT Asn	CTT Leu	CCT Pro 180	GCA Ala	582
AAT Asn	TTT Phe	GAC Asp	ACA Thr 185	TGT Cys	CAC His	AGA Arg	GCC Ala	TTG Leu 190	CAA Gln	ATA Ile	ATA Ile	GCA Ala	AGA Arg 195	TAT Tyr	GTA Val	630
CCA Pro	TCG Ser	ACA Thr 200	CCG Pro	TGG Trp	TTT Phe	CTC Leu	ATG Met 205	CCA Pro	ATA Ile	CTG Leu	GTG Val	GAA Glu 210	AAA Lys	TTT Phe	CCA Pro	678
TTT Phe 215	GTT Val	CGA Arg	AAA Lys	TCA Ser	GAG Glu	AGA Arg 220	ACA Thr	CTG Leu	GAA Glu	TGT Cys	TAC Tyr 225	GTT Val	CAT His	NAC Xaa	TTA Leu	726
CTA Leu 230	AGG Arg	ATT Ile	AGT Ser	GTA Val	TAT Tyr 235	TTT Phe	CCA Pro	ACC Thr	TTG Leu	AGG Arg 240	CAT His	GAA Glu	ATT Ile	CTG Leu 245	GAG Glu	774
CTT Leu	ATT Ile	ATT Ile	GAA Glu	AAA Lys 250	CTA Leu	CTC Leu	AAG Lys	TTG Leu	GAT Asp 255	GTG Val	AAT Asn	GCA Ala	TCC Ser	CGG Arg 260	CAG Gln	822
GGT Gly	ATT Ile	GAA Glu	GAT Asp 265	GCT Ala	GAA Glu	GAA Glu	ACA Thr	GCA Ala 270	ACT Thr	CAA Gln	ACT Thr	TGT Cys	GGT Gly 275	GGG Gly	ACA Thr	870
GAT Asp	TCC Ser	ACG Thr 280	GAA Glu	GGA Gly	TTG Leu	TTT Phe	AAT Asn 285	ATG Met	GAT Asp	GAA Glu	GAT Asp	GAA Glu 290	GAA Glu	ACT Thr	GAA Glu	918
CAT His 295	GAA Glu	ACA Thr	AAG Lys	GCT Ala	GGT Gly	CCT Pro	GAA Glu 300	CGG Arg	CTC Leu	GAC Asp	CAG Gln 305	ATG Met	GTG Val	CAT His	CCT Pro	966
GTA Val 310	GCC Ala	GAG Glu	CGC Arg	CTG Leu	GAC Asp 315	ATC Ile	CTG Leu	ATG Met	TCT Ser	TTG Leu 320	GTT Val	TTG Leu	TCC Ser	TAC Tyr	ATG Met 325	1014
AAG Lys	GAT Asp	GTC Val	TGC Cys	TAT Tyr 330	GTA Val	GAT Asp	GGT Gly	AAG Lys 335	GTT Val	GAT Asp	AAC Asn	GGC Gly	AAA Lys	ACA Thr 340	AAG Lys	1062
GAT Asp	CTA Leu	TAT Tyr	CGC Arg 345	GAC Asp	CTG Leu	ATA Ile	AAC Asn 350	ATC Ile 350	TTT Phe	GAC Asp	AAA Lys	CTC Leu	CTG Leu 355	TTG Leu	CCC Pro	1110

ACC Thr	CAT His	GCC Ala	TCC Ser	TGC Cys	CAT His	GTA Val	CAG Gln	TTT Phe	TTC Phe	ATG Met	TTT Phe	TAC Tyr	CTC Leu	TGT Cys	AGT Ser	1158
		360					365					370				
TTC Phe	AAA Lys	TTG Leu	GGA Gly	TTC Phe	GCA Ala	GAG Glu	GCA Ala	TTT Phe	TTG Leu	GAA Glu	CAT His	CTC Leu	TGG Trp	AAA Lys	AAA Lys	1206
	375					380					385					
TTG Leu	CAG Gln	GAC Asp	CCA Pro	AGT Ser	AAT Asn	CCT Pro	GCC Ala	ATC Ile	ATC Ile	AGG Arg	CAG Gln	GCT Ala	GCT Ala	GGA Gly	AAT Asn	1254
	390				395					400					405	
TAT Tyr	ATT Ile	GGA Gly	AGC Ser	TTT Phe	TTG Leu	GCA Ala	AGA Arg	GCT Ala	AAA Lys	TTT Phe	ATT Ile	CCT Pro	CTT Leu	ATT Ile	ACT Thr	1302
				410					415					420		
GTA Val	AAA Lys	TCA Ser	TGC Cys	CTA Leu	GAT Asp	CTT Leu	TTG Leu	GTT Val	AAC Asn	TGG Trp	CTG Leu	CAC His	ATA Ile	TAC Tyr	CTT Leu	1350
			425					430					435			
AAT Asn	AAC Asn	CAG Gln	GAT Asp	TCG Ser	GGA Gly	ACA Thr	AAG Lys	GCA Ala	TTC Phe	TGC Cys	GAT Asp	GTT Val	GCT Ala	CTC Leu	CAT His	1398
		440					445					450				
GGA Gly	CCA Pro	TTT Phe	TAC Tyr	TCA Ser	GCC Ala	TGC Cys	CAA Gln	GCT Ala	GTG Val	TTC Phe	TAC Tyr	NCC Xaa	TTT Phe	GTT Val	TTT Phe	1446
	455					460					465					
AGA Arg	CAC His	AAG Lys	CAG Gln	CTT Leu	TTG Leu	AGC Ser	GGA Gly	AAC Asn	CTG Leu	AAA Lys	GAA Glu	GGT Gly	TTG Leu	CAG Gln	TAT Tyr	1494
	470				475					480					485	
CTT Leu	CAG Gln	AGT Ser	CTG Leu	AAT Asn	TTT Phe	GAG Glu	CGG Arg	ATA Ile	GTG Val	ATG Met	AGC Ser	CAG Gln	CTA Leu	AAT Asn	CCC Pro	1542
				490					495					500		
CTG Leu	AAG Lys	ATT Ile	TGC Cys	CTG Leu	CCC Pro	TCA Ser	GTG Val	GTT Val	AAC Asn	TTT Phe	TTT Phe	GCT Ala	GCA Ala	ATC Ile	ACA Thr	1590
		505						510					515			
AAT Asn	AAG Lys	TAC Tyr	CAG Gln	CTC Leu	GTC Val	TTC Phe	TGC Cys	TAC Tyr	ACC Thr	ATC Ile	ATT Ile	GAG Glu	AGG Arg	AAC Asn	AAT Asn	1638
		520					525					530				
CGC Arg	CAG Gln	ATG Met	CTG Leu	CCA Pro	GTC Val	ATT Ile	AGG Arg	AGT Ser	ACC Thr	GCT Ala	GGA Gly	GGA Gly	GAC Asp	TCA Ser	GTG Val	1686
	535					540					545					
CAG Gln	ATC Ile	TGC Cys	ACA Thr	AAC Asn	CCG Pro	CTG Leu	GAC Asp	ACC Thr	TTC Phe	TTC Phe	CCC Pro	TTT Phe	GAT Asp	CCC Pro	TGT Cys	1734
	550				555					560					565	
GTG Val	CTG Leu	AAG Lys	AGG Arg	TCA Ser	AAG Lys	AAA Lys	TTC Phe	ATT Ile	GAT Asp	CCT Pro	ATT Ile	TAT Tyr	CAG Gln	GTG Val	TGG Trp	1782
				570					575					580		
GAA Glu	GAC Asp	ATG Met	AGT Ser	GCT Ala	GAA Glu	GAG Glu	CTA Leu	CAG Gln	GAG Glu	TTC Phe	AAG Lys	AAA Lys	CCC Pro	ATG Met	AAA Lys	1830
			585					590					595			
AAG Lys	GAC Asp	ATA Ile	GTG Val	GAA Glu	GAT Asp	GAA Glu	GAT Asp	GAT Asp	GAC Asp	TTT Phe	CTG Leu	AAA Lys	GGC Gly	GAA Glu	GTG Val	1878
		600					605					610				
CCC Pro	CAG Gln	AAT Asn	GAT Asp	ACC Thr	GTG Val	ATT Ile	GGG Gly	ATC Ile	ACA Thr	CCA Pro	AGC Ser	TCC Ser	TTT Phe	GAC Asp	ACG Thr	1926
	615					620					625					

CAT TTC CGA AGT CCT TCA AGT AGT GTG GGC TCC CCA CCC GTG TTG TAC 1974  
 His Phe Arg Ser Pro Ser Ser Ser Val Gly Ser Pro Pro Val Leu Tyr 645  
 630 635 640 645

ATG CAA CCC AGT CCC CTC TGACGGCAGA AATTTGTGACTG AGATGTGACA 2024  
 Met Gln Pro Ser Pro Leu 650

TTTGGGATTC CCCATC 2040

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 651 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Ala Ala Pro Leu Leu His Thr Arg Leu Pro Gly Asp Ala Ala Ala 15  
 1 5 10

Ser Ser Ser Ala Val Lys Lys Leu Gly Ala Ser Arg Thr Gly Ile Ser 30  
 20 25 30

Asn Met Arg Ala Leu Glu Asn Asp Phe Phe Asn Ser Pro Pro Arg Lys 45  
 35 40 45

Thr Val Arg Phe Gly Gly Thr Val Thr Glu Val Leu Leu Lys Tyr Lys 60  
 50 55 60

Lys Gly Glu Thr Asn Asp Phe Glu Leu Leu Lys Asn Gln Leu Leu Asp 80  
 65 70 75 80

Pro Asp Ile Lys Asp Asp Gln Ile Ile Asn Trp Leu Leu Glu Phe Arg 95  
 85 90 95

Ser Ser Ile Met Tyr Leu Thr Lys Asp Phe Glu Gln Leu Ile Ser Ile 110  
 100 105 110

Ile Leu Arg Leu Pro Trp Leu Asn Arg Ser Gln Thr Val Val Glu Glu 125  
 115 120 125

Tyr Leu Ala Phe Leu Gly Asn Leu Val Ser Ala Gln Thr Val Phe Leu 140  
 130 135 140

Arg Pro Cys Leu Ser Met Ile Ala Ser His Phe Val Pro Pro Arg Val 160  
 145 150 155 160

Ile Ile Lys Glu Gly Asp Val Asp Val Ser Asp Ser Asp Asp Glu Asp 175  
 165 170 175

Asp Asn Leu Pro Ala Asn Phe Asp Thr Cys His Arg Ala Leu Gln Ile 190  
 180 185 190

Ile Ala Arg Tyr Val Pro Ser Thr Pro Trp Phe Leu Met Pro Ile Leu 205  
 195 200 205

Val Glu Lys Phe Pro Phe Val Arg Lys Ser Glu Arg Thr Leu Glu Cys 220  
 210 215 220

Tyr Val His Xaa Leu Leu Arg Ile Ser Val Tyr Phe Pro Thr Leu Arg 240  
 225 230 235 240

His Glu Ile Leu Glu Leu Ile Ile Glu Lys Leu Leu Lys Leu Asp Val  
 245 250 255  
 Asn Ala Ser Arg Gln Gly Ile Glu Asp Ala Glu Glu Thr Ala Thr Gln  
 260 265 270  
 Thr Cys Gly Gly Thr Asp Ser Thr Glu Gly Leu Phe Asn Met Asp Glu  
 275 280 285  
 Asp Glu Glu Thr Glu His Glu Thr Lys Ala Gly Pro Glu Arg Leu Asp  
 290 295 300  
 Gln Met Val His Pro Val Ala Glu Arg Leu Asp Ile Leu Met Ser Leu  
 305 310 315 320  
 Val Leu Ser Tyr Met Lys Asp Val Cys Tyr Val Asp Gly Lys Val Asp  
 325 330 335  
 Asn Gly Lys Thr Lys Asp Leu Tyr Arg Asp Leu Ile Asn Ile Phe Asp  
 340 345 350  
 Lys Leu Leu Leu Pro Thr His Ala Ser Cys His Val Gln Phe Phe Met  
 355 360 365  
 Phe Tyr Leu Cys Ser Phe Lys Leu Gly Phe Ala Glu Ala Phe Leu Glu  
 370 375 380  
 His Leu Trp Lys Lys Leu Gln Asp Pro Ser Asn Pro Ala Ile Ile Arg  
 385 390 395 400  
 Gln Ala Ala Gly Asn Tyr Ile Gly Ser Phe Leu Ala Arg Ala Lys Phe  
 405 410 415  
 Ile Pro Leu Ile Thr Val Lys Ser Cys Leu Asp Leu Leu Val Asn Trp  
 420 425 430  
 Leu His Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Asp Ser Gly Thr Lys Ala Phe Cys  
 435 440 445  
 Asp Val Ala Leu His Gly Pro Phe Tyr Ser Ala Cys Gln Ala Val Phe  
 450 455 460  
 Tyr Xaa Phe Val Phe Arg His Lys Gln Leu Leu Ser Gly Asn Leu Lys  
 465 470 475 480  
 Glu Gly Leu Gln Tyr Leu Gln Ser Leu Asn Phe Glu Arg Ile Val Met  
 485 490 495  
 Ser Gln Leu Asn Pro Leu Lys Ile Cys Leu Pro Ser Val Val Asn Phe  
 500 505 510  
 Phe Ala Ala Ile Thr Asn Lys Tyr Gln Leu Val Phe Cys Tyr Thr Ile  
 515 520 525  
 Ile Glu Arg Asn Asn Arg Gln Met Leu Pro Val Ile Arg Ser Thr Ala  
 530 535 540  
 Gly Gly Asp Ser Val Gln Ile Cys Thr Asn Pro Leu Asp Thr Phe Phe  
 545 550 555 560  
 Pro Phe Asp Pro Cys Val Leu Lys Arg Ser Lys Lys Phe Ile Asp Pro  
 565 570 575  
 Ile Tyr Gln Val Trp Glu Asp Met Ser Ala Glu Glu Leu Gln Glu Phe  
 580 585 590  
 Lys Lys Pro Met Lys Lys Asp Ile Val Glu Asp Glu Asp Asp Phe  
 595 600 605

Leu Lys Gly Glu Val Pro Gln Asn Asp Thr Val Ile Gly Ile Thr Pro  
610 615 620

Ser Ser Phe Asp Thr His Phe Arg Ser Pro Ser Ser Ser Val Gly Ser  
625 630 635 640

Pro Pro Val Leu Tyr Met Gln Pro Ser Pro Leu  
645 650



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. Application No  
PCT/DK/00/00767

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C12N9/00 C07K16/18 C12Q1/68  
G01N33/68 C12N15/11 A61K31/70 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, STRAND, WPI Data, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YAMAMOTO ROBERT T ET AL: "RRN3 gene of Saccharomyces cerevisiae encodes an essential RNA polymerase I transcription factor which interacts with the polymerase independently of DNA template." EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 15, no. 15, 1996, pages 3964-3973, XP002143816 ISSN: 0261-4189 the whole document --- -/-	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 August 2000

Date of mailing of the international search report

18/08/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Cornec, N

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

P E 00/00767

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SCHNAPP ANDREAS ET AL: "Function of the growth-regulated transcription initiation factor TIF-IA in initiation complex formation at the murine ribosomal gene promoter."</p> <p>MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 13, no. 11, November 1993 (1993-11), pages 6723-6732, XP000929632 ISSN: 0270-7306 cited in the application the whole document</p>	1
A	<p>D. BUTTGEREIT ET AL: "Growth-dependent regulation of rRNA synthesis is mediated by a transcription initiation factor (TIF-IA)"</p> <p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH., vol. 13, no. 22, 25 November 1985 (1985-11-25), pages 8165-8180, XP002143818 OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY., GB ISSN: 0305-1048 cited in the application the whole document</p>	
A	<p>NCI-CGAP: "National cancer institute, cancer genome anatomy project (CGAP)," EMBL DATABASE ENTRY HSAA25257, ACCESSION NUMBER AA213789, 3 February 1997 (1997-02-03), XP002143819 abstract</p>	1-3
T	<p>MOOREFIELD BETH ET AL: "RNA polymerase I transcription factor Rrn3 is functionally conserved between yeast and human."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 97, no. 9, 25 April 2000 (2000-04-25), pages 4724-4729, XP002143820 April 25, 2000 ISSN: 0027-8424 the whole document</p>	1-9

## ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

## Continuation of box I.1

Although claims 13-16 relate to a method for the treatment of the human/animal body (Rule 39.1 IV PCT), a search was carried out and was based on the indicated effects of the compound/composition.

Although claim 17 (as far as it relates to in vivo methods) relates to a diagnostic method (Rule 13.1 IV PCT) carried out on the human/animal body, a search was carried out and was based on the indicated effects of the compound/composition.

## Continuation of box I.2

Claims Nos.: 10, 12, 15-18 partially

Present claims 10 and 12 relate to a product and claims 15 to 18 to the use of said product, which is characterized by a desired feature or property, namely a ligand that binds to an RNA polymerase I transcription factor TIF-IA or an antagonist that attenuates or blocks the effect of the RNA polymerase I transcription factor TIF-IA and its uses.

The patent claims therefore comprise all products etc. that have this feature or property while the patent application is supported by the description only for a limited number of such products etc. in the sense of Article 5 PCT. In the present case, the patent claims lack the appropriate support and the patent application lacks the required disclosure to such an extent that a meaningful search encompassing the entire scope of protection sought seems impossible. The claims also lack the required novelty (Article 6 PCT) since the product is defined by the respective desired result. The patent application lacks the required clarity to such an extent that a meaningful search encompassing the entire scope of protection sought seems impossible. For this reason, the search was restricted to parts of the claims that seemed to be clear, supported and disclosed according to the above mentioned terms, i.e. those parts that relate to the products that are antibodies against the RNA polymerase I transcription factor TIF-IA.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. nationales Aktenzeichen

PO E 00/00767

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/12 C07K14/47 C12N9/00 C07K16/18 C12Q1/68  
G01N33/68 C12N15/11 A61K31/70 A61K38/17

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, STRAND, WPI Data, EPO-Internal

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	YAMAMOTO ROBERT T ET AL: "RRN3 gene of Saccharomyces cerevisiae encodes an essential RNA polymerase I transcription factor which interacts with the polymerase independently of DNA template." EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, Bd. 15, Nr. 15, 1996, Seiten 3964-3973, XP002143816 ISSN: 0261-4189 das ganze Dokument  ----- -/-	1-9

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. August 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

18/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Le Cornec, N

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>SCHNAPP ANDREAS ET AL: "Function of the growth-regulated transcription initiation factor TIF-IA in initiation complex formation at the murine ribosomal gene promoter."</p> <p>MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Bd. 13, Nr. 11, November 1993 (1993-11), Seiten 6723-6732, XP000929632</p> <p>ISSN: 0270-7306</p> <p>in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	1
A	<p>D. BUTTGEREIT ET AL: "Growth-dependent regulation of rRNA synthesis is mediated by a transcription initiation factor (TIF-IA)"</p> <p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH., Bd. 13, Nr. 22, 25. November 1985 (1985-11-25), Seiten 8165-8180, XP002143818</p> <p>OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY., GB</p> <p>ISSN: 0305-1048</p> <p>in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	
A	<p>NCI-CGAP: "National cancer institute, cancer genome anatomy project (CGAP), " EMBL DATABASE ENTRY HSAA25257, ACCESSION NUMBER AA213789,</p> <p>3. Februar 1997 (1997-02-03), XP002143819</p> <p>Zusammenfassung</p>	1-3
T	<p>MOOREFIELD BETH ET AL: "RNA polymerase I transcription factor Rrn3 is functionally conserved between yeast and human."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 97, Nr. 9, 25. April 2000 (2000-04-25), Seiten 4724-4729, XP002143820</p> <p>April 25, 2000</p> <p>ISSN: 0027-8424</p> <p>das ganze Dokument</p>	1-9

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

## Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 13-16 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen (regel 39.1 IV PCT), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Obwohl die Anspruch 17 (so weit es sich um in vivo methoden handelt) sich auf ein Diagnostizierverfahren Regel 13.1 IV PCT), das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung

## Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 10, 12, 15-18 teilweise

Die geltenden Patentansprüche 10 und 12 beziehen sich auf ein Produkt und Ansprüche 15-18 auf die verwendungen dieses produkts, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich ein Ligand, der an den RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA bindet oder ein Antagonist, der die Wirkung des RNA Polymerase I Transkriptionsfaktors TIF-IA abschwächt oder blockiert und seine Verwendungen.

Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte etc., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte etc. gestützt wird. Im vorliegenden Fall sind die Patentansprüche nicht entsprechend gestützt bzw. fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend die Produkte, die Antikörper gegen den RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor TIF-IA sind.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.